

### **3. Polimorfismo de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica**

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL Y JAVIER GUALIX

#### **INTRODUCCIÓN**

El nombre de citocromo P-450 (CYP) se emplea para designar una superfamilia de proteínas que contienen el grupo hemo y generalmente función monooxigenasa. En la nomenclatura y clasificación de enzimas se incluye a todos los CYP como monooxigenasas no específicas y catalogadas bajo una misma denominación de **EC 1.14.14.1**. Los CYP 450 recibieron este nombre en 1961 cuando Ronald Estabrook observó en extractos de hígado un pico en el espectro de absorción a 450-nm cuando se realizaba en presencia de monóxido de carbono (Estabrook et al. 1963). El estudio de la estructura, funciones y diversidad del P-450 se vio en un principio obstaculizada por su naturaleza de proteína hidrofóbica asociada a las membranas. Durante los años 60 y 70 se descubrió su importancia en el metabolismo de esteroides y sustancias xenobióticas, entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos a los que conferían una mayor capacidad carcinogénica al ser hidroxilados. Actualmente los CYP se consideran enzimas clave en procesos de síntesis y degradación de los derivados del ácido araquidónico, hormonas y otros derivados esteroídicos, y del ácido retinoico etc...

La gran variedad y funciones de los citocromos P-450 no fue comprendida en todo su valor y dimensión hasta que surgen las primeras técnicas de aislamiento de los RNAm y obtención de los cDNA respectivos, a partir de las cuales por homología de secuencia se han caracterizado

más de 600 genes entre los seres vivos, los cuales se han agrupado en 270 familias. Existe una sorprendente similitud entre bacterias y humanos, sugiriendo la aparición de un gen ancestral común hace unos 3 billones de años. El conocimiento de la secuencia de diversos genomas tanto del ser humano como de bacterias y plantas ha permitido obtener una amplia panorámica del citocromo P-450. La gran abundancia de estos genes en plantas, citando el ejemplo de la *Arabidopsis thaliana*, que contiene 249 genes, lo que representa el 1% de su genoma, indica la enorme variedad de reacciones para la que son necesarios en el reino vegetal, incluidas las de resistencia a pesticidas.

La abundancia y variedad de estos genes y el caos existente en su denominación, según las reacciones y productos formados, o según los organismos en que se encontraban, requirió un esfuerzo de consenso por parte de los científicos para agruparlos y hacer más racional su nomenclatura. En la actualidad se agrupan según el porcentaje de homología en sus secuencias del modo siguiente:

**1. Familias.**—Los citocromos P-450 (CYP) que comparten un 40% de homología o superior, constituyen una familia, cada familia recibe un numero: CYP1, CYP2, CYP3,.....CYP270. En la actualidad hay unas 270 familias clasificadas entre todos los seres vivos, de las cuales están presentes en humanos 18 del conjunto.

**2. Subfamilias.**—Dentro de cada familia CYP hay subfamilias y para ser miembro de una de ellas hay que compartir el 50% de homología de secuencia o superior. Cada miembro de una subfamilia se indica por una letra después del numero de familia. CYP1A, CYP2B, etc.

**3. Polipéptidos ó miembros de las subfamilias.**—Dentro de cada subfamilia puede aparecer otro CYP que tenga mas de 55% de homología y entonces se indica después de la letra un numero, CYP2C8, CYP2C9, etc. Estos números indican la abundancia de miembros dentro de una subfamilia. Cada uno de los polipéptidos que codifican los CYP, procede de un transcrito primario del gen que puede, en algunos casos, ser procesado de modo alternativo, produciendo diferentes RNAm y por consiguiente diferentes proteínas, las cuales pueden tener diferentes capacidades de reconocimiento y catálisis de los sustratos oxidables.

**4. Variantes alélicas de los polipéptidos CYP y polimorfismos debidos a un único nucleótido (SNP).**—Cada uno de los polipéptidos que codifican los CYP puede presentar variantes alélicas, en los que generalmente una única base, o un reducido numero de bases del DNA para un gen con localización precisa en el genoma está cambiado, y por consiguiente la secuencia de aminoácidos. Estas variantes alélicas se indican con asterisco después del numero y otro numero posterior para identificar la variante, CYP2C9\*1. En algunos casos las variantes alélicas se nombran con letras CYP2D6(A), según la nomenclatura antigua y por el momento se pueden encontrar ambas todavía. La doble dotación genética, de origen paterno y materno en los seres humanos, permite tener dos genes CYP del mismo tipo, los dos genes pueden ser idénticos alelos, o diferentes, si existen polimorfismos. Algunos CYP tienen variantes alélicas más abundantes según los diferentes tipos de poblaciones y etnias y son punto de partida en estudios de farmacogenética. La accesibilidad de las técnicas de secuenciación de los ácidos nucléicos ha permitido realizar estudios extensivos de cada citocromo y las variantes de un único nucleótido SNP, estos datos son importantes para interpretar el efecto de diferentes sustancias transformaciones metabólicas y se acogen bajo el epígrafe de farmacogenómica.

*En humanos hay actualmente descritos 57 genes CYP, y 33 pseudogenes, agrupados en 18 familias y 42 subfamilias. La amplia variedad de reacciones en las que participan, tanto del anabolismo, como del catabolismo de productos endógenos, sobre todo de productos de señalización, hormonales o locales, de naturaleza lipídica (esteroides, vitamina D, derivados de ácido araquidónico, ácido retinoico etc...), así como de productos externos, de la dieta, fármacos, ó contaminantes ambientales, hacen que alteraciones en estos genes puedan redundar en enfermedades hereditarias, o en una cierta inferioridad para reaccionar frente a compuestos potencialmente peligrosos. Hoy día el análisis genético de estas susceptibilidades o resistencias debidas a polimorfismos del CYP, se estudian dentro de la farmacogenómica, toxicogenómica, genómica del cáncer, genómica del desarrollo etc., pero en cualquier caso es solamente una muestra de la diversidad humana y sus esperanzas para contar con algún individuo o grupo capaz de hacer frente como especie a las nuevas situaciones que la naturaleza ó su destrucción nos depare.*

## **ASPECTOS GENERALES DE LOS CYP: ESTRUCTURA, INTERACCIONES CON LA REDUCTASA DE MEMBRANA, IMPORTANCIA FISIOLÓGICA**

Cuando pensamos en un enzima monooxigenasa del tipo CYP (EC 1.14.14.1) tenemos la idea de los enzimas del metabolismo según la cual cualquier alteración del centro activo, en el que se modifique el reconocimiento del sustrato, redundaría normalmente en una enfermedad hereditaria más o menos grave según la ruta metabólica. Esta idea es cierta en el caso de los CYP cuando estos toman parte en la síntesis de esteroides, como la esterol-27-hidroxilasa (CYP27A), o de la vitamina D<sub>3</sub>, la 24-hidroxilasa (CYP27B). En estos casos, la alteración del sitio de reconocimiento y su eficiencia catalítica, en alguno de los polimorfismos existentes, resulta en un cuadro clínico con signos específicos más o menos acusados según la variación y asimilable a las enfermedades hereditarias monogénicas clásicas. No obstante cuando las modificaciones de la secuencia ocurren en los CYP que pertenecen a los que se dedican fundamentalmente al metabolismo de los xenobióticos, las manifestaciones clínicas adversas, o las ventajas, pueden ser muy variables, e incluso ser latentes hasta que el individuo se pone en contacto con los sustratos.

### **Estructura de los CYP**

Los citocromos P-450 son hemoproteínas asociadas fundamentalmente con las membranas microsomales del retículo endoplasmático, donde participan en múltiples reacciones de hidroxilación, como monooxigenasas. Además de esta localización en el retículo endoplasmático, la mayoría de las células de mamíferos posee otro sistema de monooxigenasas que también contienen el P-450, pero localizadas en la membrana externa mitocondrial. Es este último sistema el que juega el papel metabólico más relevante en relación con el metabolismo del colesterol para la síntesis de hormonas esteroídicas y otros derivados, siendo especialmente abundantes en el tejido de la corteza suprarrenal y en cerebro, donde sus niveles son más altos que los correspondientes a las membranas microsomales.

Los primeros CYP-450 en ser cristalizados y que permitieron un conocimiento de la organización espacial de la proteína y de sus zonas funcionales, estudiadas mediante mutagenesis dirigida, eran de origen bac-

teriano. Esta estructura terciaria fue posteriormente confirmada al cristalizar otros citocromos de origen animal, como el CYP2C5 de conejo (Williams *et al.* 2000) y más recientemente el CYP2C9 humano, que es responsable de un alto porcentaje del metabolismo de fármacos (Williams *et al.* 2003). Una visión un tanto esquemática y generalizada de la estructura terciaria de un CYP-450 está representada en la figura 1.

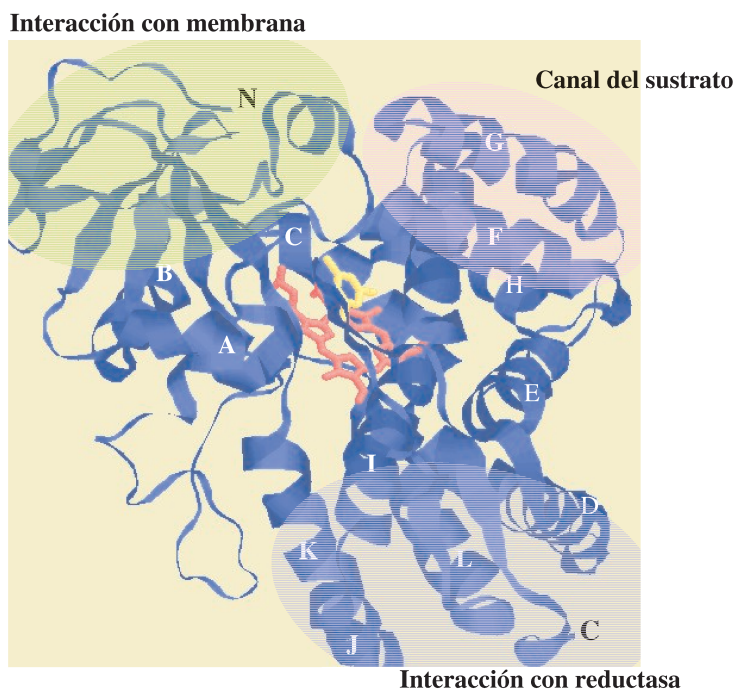


FIGURA 1. Aspectos generales de la estructura de los CYP

Los CYP presentan diversas zonas funcionales, siguiendo un patrón estructural común, a pesar de la amplia diversidad de reacciones que realizan. En la figura se han destacado tres zonas, en primer lugar la parte del amino inicial con estructura predominante en hoja plegada, que se ancla en la membrana microsomal. Esta zona está espacialmente próxima al lugar de reconocimiento del sustrato (representado en amarillo en la figura) formado por las hélices G-F. Muchos de los sustratos son de naturaleza hidrofóbica y necesitan incluirse en la membrana antes de ser reconocidos por el gran embudo hidrofóbico en esta zona de reconocimiento. La cisteína que da la quinta valencia de coordinación y ancla el grupo hemo (representado en rojo), está localizada en el asa que se observa por detrás de dicho grupo, antes del inicio de la hélice I, la cual contiene próxima al hemo una treonina que se requiere para transferir electrones en la reacción de hidroxilación. La zona de interacción con la reductasa es fundamentalmente hidrofóbica y suele ser una zona muy conservada en los diferentes citocromos.

La estructura y función de los CYP-450, es más fácil de comprender si se estudia comparativamente con las de otras hemoproteínas de naturaleza y función conocida en detalle, la mioglobina (153 aminoácidos) y las cadenas  $\alpha$  (141 aminoácidos) y  $\beta$  (146 aminoácidos) de la hemoglobina. En todas ellas la estructura secundaria es mayoritariamente en  $\alpha$ -hélice, más del 70%, y alojan un grupo hemo capaz de unir el oxígeno molecular en un bolsillo hidrofóbico, aunque en los CYP la quinta valencia de coordinación del hierro hemínico, lo proporciona el grupo  $-SH$  de la cisteína. Además, los CYP contienen entre 3 y 3,5 veces mayor número de aminoácidos, el cual oscila entre 400 y 520 residuos. De modo análogo a las hemoglobinas y mioglobinas, los tramos en  $\alpha$ -hélice de los CYP están numerados e identificados como letras consecutivas en la secuencia (Graham-Lorence and Peterson 1996). En la figura 1 se muestra un modelo generalizado de la estructura de los CYP-450, destacando las zonas funcionales de la proteína y la situación espacial de las hélices convenientemente nombradas con letras, desde el grupo amino-terminal al carboxilo-terminal.

Esta diferencia en el número de residuos, comparando con las cadenas de globina, es lo que confiere a los CYP otras zonas activas aparte de la fijación del oxígeno, como son la zona de reconocimiento de sus sustratos, localizado sobre todo en las hélices F-G y el túnel de acceso al hemo formada por estas mismas hélices F-G y la B'-C. Estas hélices forman una especie de embudo que dirige el sustrato hacia la zona catalítica de hidroxilación. La longitud de este túnel hidrofóbico depende del tipo de citocromo y define la especificidad por los diferentes sustratos susceptibles de ser hidroxilados. Curiosamente cuando se comparan miembros de la misma familia de citocromos, es corriente que las mayores frecuencias de variación se produzcan en esta zona de reconocimiento, aportando así una cierta analogía con la zona variable de las inmunoglobulinas y su posibilidad de hacer frente a sustratos endógenos o agentes agresores de naturaleza química muy diversa. Es de destacar que el sustrato de hidroxilación ocupa una parte muy reducida del lugar de reconocimiento y se ha postulado recientemente que podría alojar más de una molécula, produciéndose interacciones de competición en el propio centro funcional (Williams et al. 2003).

El núcleo central del CYP lo constituyen las hélices que dan cohesión y envuelven al hemo, que son las hélices J, K, las hojas plegadas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , una zona con estructura en asa denominada meandro, que esta se-

guida por la hélice L. La cisteína que da la quinta valencia de coordinación del hemo esta situada en el meandro muy próxima al inicio de la hélice L, este residuo se conserva en todos los CYP estudiados. Otro residuo altamente conservado es la treonina de la hélice I, que se encuentra muy próxima espacialmente al hemo y es importante en la canalización de los electrones al centro catalítico.

Otra zona importante de los CYP es la derivada de su necesidad de anclaje en las membranas microsomales para ser funcionales, con el correspondiente requerimiento de exponer residuos hidrofóbicos en su superficie externa. Este anclaje es el que permite el acceso de los electrones por parte de la minicadena de transporte desde el NADPH, a través de los grupos de flavina, FAD y FMN, del enzima reductasa, hasta el hemo del CYP. En una situación normal suelen existir entre diez y cuarenta moléculas de CYP de diversa naturaleza, por cada molécula del enzima reductasa, en las membranas microsomales hepáticas. Esta situación implica una cierta competencia entre los diferentes CYP para asociarse con el donador de electrones y formar complejos dinámicos por su capacidad de difusión lateral. En la membrana externa mitocondrial, la cadena de transporte de electrones tiene un elemento adicional entre el CYP y la reductasa, la proteína adrenodoxina, que contiene un núcleo ferro-azufrado y participa en el transporte de electrones.

Las diferentes zonas funcionales de los CYP tienen también su reflejo en los genes, los cuales presentan múltiples exones que suelen codificar las secuencias proteicas de zonas con una función o actividad específica. Muchos de los genes CYP tienen varias zonas de iniciación, por lo que los genes al expresarse pueden presentar secuencias diversas en el amino inicial, también son frecuentes los procesamientos alternativos en la zona carboxilo terminal. Los procesamientos alternativos en las zonas de reconocimiento de sustrato y catalíticos, tienen como resultado la posibilidad de realizar con un único gen reacciones diversas.

### **Aspectos generales de la actividad monooxigenasa de los CYP-450**

La gran mayoría de las reacciones en las que participan los P-450 se recogen bajo la clasificación enzimática con el numero EC 1.14.14.1, actividad monooxigenasa con el NADPH como donador de dos electrones. Resultando de modo general:





En estas reacciones es el tipo de citocromo es el que confiere la especificidad de sustrato de la reacción.

Como hemos indicado en el apartado anterior, en el retículo endoplasmático el CYP está asociados a la citocromo P-450 reductasa. Este enzima por sus grupos de flavina, uno de FAD y otro de FMN, puede transferir los electrones desde el coenzima NADPH de uno en uno al grupo hemo del citocromo, permaneciendo como radicales con un electrón desapareado por un corto espacio de tiempo. Es importante un buen acoplamiento entre los dos sistemas, y se postula que solamente cuando los CYP tienen sustratos asociados pueden unirse eficazmente con la reductasa de la membrana (Backes and Kelley, 2003). De otro modo, los electrones que llegan al grupo hemo se transferirían directamente al oxígeno molecular produciéndose ion superóxido, al tomar un electrón, o bien agua oxigenada al tomar dos electrones y dos protones del medio. Estas reacciones secundarias con producción de especies reactivas de oxígeno, ROS, ocurren incluso en presencia de sustrato, siendo este enzima uno de los menos eficientes y causando siempre unos ciertos niveles de estrés celular. Este hecho es importante, pues el incremento excesivo de los niveles de CYP hepáticos, aunque sean los genes más idóneos dentro de los polimorfismos, incluso en ausencia de sustrato pueden resultar perjudiciales. También explica la importancia del control de expresión en las zonas promotoras, para evitar su presencia masiva y la relevancia de las mutaciones en las zonas catalíticas y de reconocimiento de sustrato, así como en la interacción con la reductasa. Es esta última zona en la que suelen aparecer menos cambios a lo largo de la evolución en una misma familia. Destacar de nuevo que en las mitocondrias de los tejidos con elevada síntesis de derivados hormonales del colesterol, como la corteza adrenal y el cerebro, el P-450 mitocondrial es muy abundante y en este contexto la transferencia de electrones desde la reductasa requiere de la ya mencionada proteína ferro-azufrada conocida como adrenodoxina. En esta localización los razonamientos esgrimidos de reconocimiento y función de los CYP microsomaes siguen siendo validos.

La escasa eficiencia de la reacción medida por la relación entre el gasto de NADPH con respecto al producto hidroxilado ya sea en el enzima microsomal o el mitocondrial, que pocas veces alcanza el 50% en células de



mamíferos, mientras que en bacterias alcanza más del 95%, hace plantearse la pregunta de si estos CYP tienen otras funciones. La falta de eficiencia resulta siempre en producción de especies reactivas de oxígeno, ROS, ya sea el ion superóxido, o agua oxigenada y se piensa que puedan ser inductores de apoptosis, participando en el dialogo entre el citocromo C mitocondrial y el citocromo *b5* de las membranas del retículo (Davydov 2001). Un esquema general de la ubicación del CYP y la reductasa, así como las reacciones secundarias del sistema se encuentran en la Figura 2.

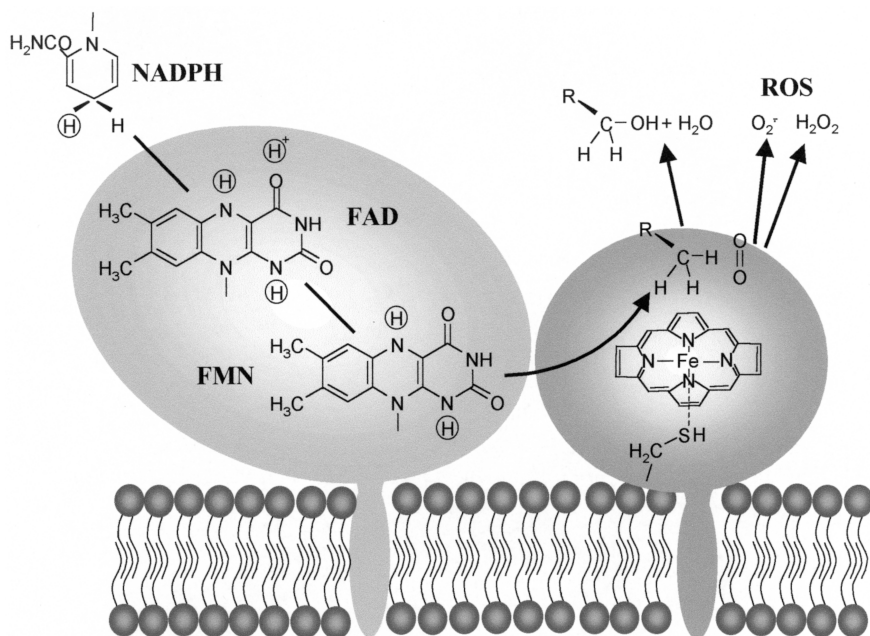


FIGURA 2. Localización de los CYP en las membranas microsomales

Los CYP se localizan en las membranas microsomales y mitocondriales, donde necesitan interactuar con el enzima reductasa para poder realizar su función. El transporte de electrones necesita hacerlos llegar al hierro hemínico de uno en uno, para lo que se necesita que el anillo de flavina, el FMN, permanezca como radical por un corto espacio de tiempo  $\text{FMNH}^*$ . La presencia de sustrato es necesaria para un correcto acoplamiento entre el citocromo y la reductasa para realizar el transporte de electrones desde el NADPH para la reacción de hidroxilación. La eficiencia de la reacción de hidroxilación suele ser muy escasa y se originan especies reactivas de oxígeno (ROS), incluso en ausencia de sustrato. La relación molecular de CYP a reductasa en las membranas microsomales es de 10 a 1 o superior, y tanto las diferentes especies de CYP como las reductasas disponen de un amplio margen de movilidad en las membranas.

La capacidad para metabolizar diferentes productos por los CYP, utilizando todos ellos la misma cadena de transporte de la reductasa significa una gran ventaja evolutiva por su versatilidad, aunque pagando el tributo de su baja eficiencia. Es de destacar que otros sistemas enzimáticos mantienen asociados los dos dominios en una única cadena polipeptídica, como es el caso de las oxido nítrico sintasas, NOS (neural, endotelial e inducible). El dominio oxigenasa de las NOS contiene un grupo hemo y tiene una zona reguladora a la que se une, entre otros efectores, la calcio calmodulina, y es susceptible de fosforilación por protein quinasas. Como el único sustrato es la L-arginina, que produce el NO y citrulina, no se necesitan zonas de reconocimiento de sustrato distintas en las tres isoenzimas, que son codificadas por tres genes, con un control de expresión diferente en su zona promotora.

No obstante las citocromo P-450 reductasas, como tienen que actuar sobre sustratos muy diversos, tienen la zona oxigenasa separada (los citocromo P-450), que es donde está el grupo hemo y la zona de reconocimiento del sustrato (fármaco, tóxico, sustratos fisiológicos, etc...). Al no estar en el mismo gen y no formar parte de la misma proteína el genoma se ahorra repetir o multiplicar el dominio reductasa del enzima y ofrece la variación en una proteína codificada por diferentes genes, como son los CYP, ofreciendo además muy variadas posibilidades del control de su expresión (Honkakoski and Negishi 2000).

*Una pregunta que surge de la coexistencia de diferentes CYP con la reductasa en la membrana celular es si existe alguna interacción estable, o si pueden los citocromos interferir entre si.* Esta pregunta, además del lógico interés cinético y físico-químico plantea la posibilidad de interacciones entre citocromos diferentes que pueden resultar perjudiciales al alterar la eficiencia de otros y que pueden plantear problemas al incrementarse sus niveles tras inducir su expresión. Los datos que existen indican que el comportamiento de los citocromos en las membranas es muy diferente del obtenido cuando se purifican, lo que produce una tendencia a la asociación. En las membranas biológicas los CYP disfrutarían de una amplia capacidad de movimiento, estando asociados con la reductasa solamente una fracción del total. Este dato ha sido corroborado haciendo interaccionar dos citocromos con sustratos diferentes (CYP1A2 y CYP2B4) con la reductasa en membranas reconstituidas, la presencia de ambos no parece alterar la

velocidad de metabolismo entre si, siempre que los sustratos estén en niveles razonables y no tóxicos, e incluso puede facilitar la interacción posterior del otro citocromo. *El factor que parece ser determinante para la asociación de los citocromos a la reductasa es la presencia del sustrato específico (Backes and Kelley, 2003).*

## **CLASIFICACIÓN TENTATIVA DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP. ¿SE PODRÍAN RACIONALIZAR LOS DISTINTOS TIPOS DE POLIMORFISMOS?**

*Teniendo en cuenta la amplia diversidad de los enzimas CYP, una de las preguntas es si sería posible tratar de establecer una clasificación tentativa general de los múltiples alelos y variantes SNP que permita de modo racional prever los efectos de los cambios según su localización en la secuencia proteica.*

De modo similar a lo establecido para las hemoglobinas si pensamos que cada CYP-450 contiene una estructura modélica supramolecular y generalizable para todos los miembros de la familia, se podrían racionalizar los diferentes subtipos según su estructura función y avanzar la siguiente propuesta en base a la eficiencia del sistema:

**1) Polimorfismos en la zona de interacción con el hemo y reacción de monooxigenasa.** Teniendo en cuenta en este apartado la transferencia de electrones del hemo al oxígeno molecular y la mayor o menor producción de ión superóxido, ó de agua oxigenada, es decir de fracasos en la reacción de rotura del oxígeno molecular, con la consecuente hidroxilación de sustrato, estas mutaciones (SNP, o variantes alélicas importantes), podrían ser silenciosas respecto al metabolismo total del fármaco ó compuesto endógeno, pero importantísimas respecto a la producción de especies reactivas de oxígeno en gran cantidad, con toxicidad celular de difícil ubicación. Es posible también que la alteración resulte en un incremento en la eficiencia catalítica, permitiendo un metabolismo acelerado de los compuestos, en cuyo caso serían relevantes en farmacocinética.

**2) Cambios en la zona de reconocimiento y unión del sustrato.** Modificaciones en esta zona de la proteína CYP, podrían llevar a la per-

dida de capacidad para metabolizar ciertos compuestos, ya sean endógenos o xenobióticos, así como a la capacidad de reconocimiento de otros nuevos compuestos. Se podría prever que si son compuestos endógenos (hidroxilación de esteroides hormonales, ácidos grasos etc.) se produciría una enfermedad metabólica clásica, mientras que si son xenobióticos, es de esperar cambios en algunas propiedades farmacocinéticas o habilidades nuevas frente a otros compuestos.

**3) Polimorfismos en la zona de anclaje en la membrana del retículo e interacción con la enzima reductasa.** Estas alteraciones pueden producirse por la sustitución de los aminoácidos hidrofóbicos por otros más hidrofílicos en las zonas de anclaje e interacción. Sin duda la eficiencia de la minicadena de transporte se vería seriamente alterada y por consiguiente el metabolismo del compuesto sustrato de la reacción. Es este un aspecto poco destacado, pero muy importante en todas las situaciones de estrés y hepatotoxicidad, pues se sospecha que la mayoría de las especies reactivas de oxígeno en el citosol hepático proceden de esta reacción, de ahí la importancia de limitar el consumo de fármacos que induzcan la expresión de los CYP.

**4) Polimorfismos en las zonas promotoras no codificantes.** Los niveles de citocromos P-450, aunque sean constitutivos, están sometidos a complejos mecanismos para regular su expresión. Actualmente se ha constatado que muchos de los polimorfismos lo son en el control de la expresión en la zona no codificante del gen y tendrían considerable importancia a la hora de la inducción de la expresión por diferentes fármacos u otros xenobióticos, pudiendo incluso carecer completamente de la proteína codificada.

**5) Polimorfismos debidos a formación de cadenas incompletas** por aparición de un codón de terminación prematura. En este caso la proteína suele carecer por completo de actividad enzimática.

**6) Otros polimorfismos.** Bajo este epígrafe podrían considerarse otras modificaciones en zonas que mantienen la configuración espacial del CYP, o su interacción con el medio citosólico, ya sean solventes, iones u otras proteínas solubles. Se considera también que el CYP podría interaccionar con otros citocromos de la familia CYP, u otros presentes en las membranas del retículo como el citocromo b5.

**7) Posibilidades industriales: farmacéuticas, alimentarias y cosméticas de los polimorfismos del P-450.** Aunque este capítulo está dedicado casi en exclusiva a los polimorfismos relevantes para el ser humano, es de destacar la enorme importancia de las reacciones catalizadas por estas enzimas en el reino vegetal, bacteriano y fúngico. De su variedad y especificidad se hace uso hoy en día en las reacciones industriales, para introducir hidroxilaciones específicas en compuestos de naturaleza compleja, como los esteroides, leucotrienos, prostaglandinas, derivados de ácido retinoico, estatinas, antibióticos, etc, necesarios en la industria farmacéutica. Más recientemente se han empezado a entrever las enormes posibilidades en la industria de los colorantes, perfumes y aditivos de la industria alimentaria, en donde se ha conseguido realizar modificaciones de hidroxilación en compuestos aromáticos y cadenas alquílicas ó isoprenoides, modificando las zonas de reconocimiento de los CYP mediante mutagénesis dirigida, o bien localizando los propios polimorfismos y variantes existentes en las diferentes especies vegetales ó microbianas. Este campo será de máximo desarrollo en las próximas décadas (Guengerich, 2002).

## **PRINCIPALES POLIMORFISMOS DESCRITOS POR FAMILIAS, SIGNIFICADO E IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA EN HUMANOS**

Desde el punto de vista de la adaptabilidad y supervivencia de las especies, es importante contar con individuos dentro de una población que sean capaces de hacer frente a factores nuevos en su entorno. Esta diversidad es una condición previa a la selección darwiniana y es muy posible que en las épocas de hambruna, o hábitos alimentarios con productos conteniendo sustancias tóxicas, se haya producido una selección de individuos más resistentes. Podríamos citar como ejemplo la intoxicación con los alcaloides del cornezuelo (hongo *claviceps purpurea*, ergot) que se produjeron de modo sistemático durante la edad media en las poblaciones europeas que consumían pan de centeno. El alto grado de abortos y la gangrena de las extremidades como consecuencia del efecto vasoconstrictor de la ergotamina (agonista parcial de receptores de serotonina) y otros derivados, seguramente favoreció la supervivencia de individuos efectuando una eliminación muy rápida y no tóxica de estas sustancias.

*Pero la visión de los CYP como meros enzimas metabolizadores de xenobióticos es simplemente miope y solamente algunas familias CYP ejercen esta acción de forma mayoritaria y generalmente compatibilizándola con la síntesis o degradación de compuestos propios, que resultan esenciales para el funcionamiento y desarrollo del organismo.*

De las 27 familias de citocromos CYP presentes en humanos, hablaremos solamente de las más importantes, destacando los sustratos fisiológicos y aspectos de enfermedades hereditarias asociadas y su relación con el metabolismo de fármacos cuando ese aspecto sea relevante (Nebert 2000; Nebert and Rusell, 2002; Evans and McLeod, 2003).

## **Familia CYP1**

La familia CYP1 en humanos tiene dos subfamilias A y B y un total de tres genes: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1.

El gen CYP1A1 se encuentra en el cromosoma 15 y se expande a lo largo de 5993 pares de bases, conteniendo 9 exones. En el mismo cromosoma 15 y muy próximo en la secuencia se encuentra el CYP1A2, que se expande a lo largo de 7757 pares de bases, también contiene 9 exones. A pesar de la homología de secuencia el CYP1B1 se encuentra en el cromosoma 2, se expande a lo largo de 8964 pares de bases y contienen solamente 4 exones.

El CYP1A1 fue el primero descubierto y relacionado con la toxicidad e incremento de propiedades carcinogénicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), los cuales son capaces de inducir la expresión de sus genes. Los primeros estudios se deben a Elizabeth y James Miller en 1957, quienes observaron que tratando a los animales con benzo(a)pireno, estos eran capaces de metabolizar mejor este hidrocarburo en aplicaciones posteriores, así como otros hidrocarburos de naturaleza aromática.

La idea de que las sustancias aromáticas podían inducir su propia destrucción, es anterior al conocimiento de la existencia de los citocromos P-450. El metabolismo de estos PAH puede generar compuestos con mayor poder carcinogénico. La inducción del CYP1A1 exhibe polimorfismo genético y el fenotipo se presenta como autosómico dominante. Los

hidrocarburos aromáticos más relevantes en la inducción de este citocromo en individuos en ambiente normal son el humo de los cigarrillos, los alimentos cocinados a la parrilla y el humo procedente de incineraciones industriales.

El polimorfismo del CYP1A1 para su expresión introduce un nuevo elemento, y es la necesaria presencia de una proteína citosólica, cuya función es la de receptor de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) denominada AhR, en su ausencia no se induce el CYP1A1. Este receptor citosólico para ser funcional necesita del receptor nuclear Arnt. El hidrocarburo aromático al llegar al citosol, fundamentalmente de hígado, se une rápidamente al receptor citosólico, AhR, en ausencia de síntesis de proteína. Esto indica que los mecanismos de inducción preexisten en ausencia de CYP1A1. En la célula intacta para evitar que este receptor citosólico AhR viaje al núcleo, esta proteína se encuentra asociada a la HSP90 (proteína del shock térmico). El receptor citosólico y el nuclear forman un dímero interaccionando entre sí por estructuras HLH (helice-loop-hélice) y uniéndose al DNA en las secuencias de respuesta a xenobióticos. La porción aminoterminal del dímero es de carácter básico e interacciona con la hendidura mayor del DNA de carácter ácido, originando una distorsión. Al dímero se asocian por su parte carboxiterminal los factores de transcripción a los que se unirá después la RNA Polimerasa II, actuando varias secuencias de modo cooperativo, para permitir el anclaje de la maquinaria de transcripción (Honkakoski and Negishi 2000).

**Sustratos de la familia CYP1.** Toda la familia CYP1 es capaz de metabolizar los hidrocarburos aromáticos, aunque el CYP1A2 prefiere las arilaminas y las aminas cíclicas. Pero es importante señalar que además de su acción sobre los productos exógenos, conforme se avanza en el conocimiento de estas enzimas, se descubre que todos ellos tienen acciones sobre compuestos procedentes del metabolismo endógeno. Este es el caso del CYP1A1 que también inactiva la prostaglandina G2. Los CYP1A2 y CYP1B1 son capaces de hidroxilar los estrógenos, aunque en diferentes posiciones cada uno de ellos. El CYP1A2 también oxida el uroporfirinógeno y la melatonina, así como una veintena de fármacos conteniendo N-heterociclos. Los CYP1B1 y CYP1A1, no parecen actuar sobre los fármacos existentes en el mercado actual. El CYP1B1 parece tener un papel en el metabolismo del ácido retinoico.



**Polimorfismos y alteraciones CYP1.** Se han descrito múltiples variantes de los genes de esta familia. **Existen del CYP1A1** al menos 15 alelos SNP que han sido validados. Uno de los polimorfismos más relevantes atañe al cambio de una isoleucina por valina en el exón 7, aminoácido que ocupa la posición 462 en la secuencia. Este cambio proviene del cambio de una única base A por G en el exón 7 (2455 A>G), se denomina CYP1A1\*2C, tiene actividad hidroxilásica y se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer de boca, asociado con fumar hojas de betel.

Otro polimorfismo de T por C en la posición 3801 de la secuencia génica, CYP1A1\*2A, favorece la aparición de cáncer de pulmón y colon en los homocigóticos (Vineis et al. 2003). Otros alelos del tipo silvestre CYP1A1\*1, muestran cambios en la zona no codificante, que no afectan a la proteína.

EL CYP1A2, se induce de modo similar al CYP1A1, aunque la dioxina es una de las sustancias más eficaces en la inducción. El CYP1B1 también se induce por hidrocarburos aromáticos

**Del CYP1A2** se han descrito al menos 4 variantes, de las cuales dos de ellas corresponden a la capacidad de inducción y se encuentra en zonas no codificantes. Existe una amplia variación en la capacidad enzimática de este citocromo según los grupos étnicos, aproximadamente un 50% de los caucasianos son metabolizadores lentos o intermedios. En ausencia de un ensayo genotípico claro, los metabolizadores lentos y rápidos se han establecido con respecto a la capacidad del CYP1A2 de metabolizar la cafeína, asociándose los metabolizadores rápidos a una mayor propensión a padecer cáncer de colon y vejiga.

**El CYP1B1** presenta múltiples polimorfismos, con al menos 13 SNP validados, como dato relevante destacar que mutaciones en este gen causan glaucoma congénito primario (buphthalmos), en algunos casos se produce un cambio en una base que origina un codon de terminación, el gen truncado produce una proteína incompleta sin función. Esta observación sugiere que el desarrollo de la cámara anterior del ojo durante la embriogénesis requiere el metabolismo de un importante sustrato endógeno por parte de el CYP1B1. Como este citocromo participa en la biosíntesis y degradación del ácido retinoico se cree que esta pueda ser la relación causal con el glaucoma familiar primario (Soley et al. 2003).

## Familia CYP2

La familia CYP2 es la familia más amplia en todas las especies de mamíferos y contiene 16 genes en humanos, organizados en 13 subfamilias, 12 de estos genes están en el gran grupo localizado en el cromosoma 19 y los 4 restantes en el cromosoma 10.

**La subfamilia A, CYP2A**, tiene en humanos los siguientes representantes: CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13 y CYP2A18, todos ellos en el cromosoma 19. Tienen acciones en el metabolismo de algunos fármacos, y sus funciones sobre sustratos endógenos son poco conocidas. De todos los miembros de la familia es el CYP2A6 el más estudiado, el gen se expande 6896 pares de bases y contiene 11 exones. Este citocromo hidroxila la cumarina y sobre todo metaboliza la nicotina, y también su principal metabolito, la cotinina, por lo que se ha postulado como un gen que protege de la adicción al tabaco.

Existe para este CYP2A6 una amplia variación entre individuos y etnias, tanto en niveles de expresión como en actividad. Actualmente se han caracterizado 13 variantes genéticas (CYP2A6\*1-\*11 y la duplicación genética \*1x2). Una gran mayoría de estos alelos tienen una actividad alterada, algunos resultan inactivos debido a delección, actividad disminuida por bajos niveles de su expresión, modificaciones en la proteína, o una actividad incrementada por duplicación genética. El interés actual de este citocromo y sus polimorfismos y alelos, se debe sobre todo a sus posibles efectos en la adicción al tabaco, y en la repercusión en el cáncer de pulmón (Xu et al. 2002).

**La subfamilia B, CYP2B**, tiene en humanos dos miembros CYP2B6 y CYP2B7, con funciones poco estudiadas y que pertenecen al gran grupo de citocromos presentes en el cromosoma 19, junto con la subfamilia A y otros muchos. Se ha postulado que actúan sobre sustratos endógenos, y algún fármaco.

**La subfamilia C, CYP2C**, tiene en humanos cuatro genes, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19. Estos cuatro genes metabolizan más del 50% de los fármacos prescritos más frecuentes, de ahí su importancia. Además se van conociendo sus sustratos endógenos, pudiendo actuar sobre derivados del ácido araquidónico y algunos esteroides. Los cuatro genes se encuentran codificados en el cromosoma 10.

**El CYP2C8** está presente en una concentración relativamente alta en el hígado de la especie humana, interviniendo en el metabolismo de fármacos importantes terapéuticamente, como el diterpenoide derivado del taxol, el paclitaxel, empleado como agente antineoplásico; la rosiglitazona, un antidiabético oral, que estimula la expresión de los genes implicados en el metabolismo glucídico y lipídico a través de su unión a los receptores nucleares conocidos como activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), la cerivastatina, uno de los inhibidores mas poderosos del enzima clave en la síntesis de colesterol, la HMGCoA-reductasa, y otros derivados isoprenoides, también metaboliza el verapamil, el todo-trans-retinol, la amiodarona, dapsona etc (Baldwin et al 1999; Muck et al. 2000). El CYP2C8 además de su acción sobre fármacos xenobióticos, tienen acciones en el metabolismo de los derivados del ácido araquidónico, y especialmente de los derivados hidroxilados que van a originar los factores hiperpolarizantes derivados de endotelio (HETEs, HPETEs). *La capacidad de producir compuestos activos a partir del ácido araquidonico es un aspecto recurrente en miembros de las familias de citocromos 1, 2, 3, 4, 5 y 8 (Nebert and Russell, 2002).*

La especificidad del CYP2C8 por su sustrato es muy escasa y existe solapamiento con otros citocromos, pudiendo actuar sobre algunos sustratos tanto el CYP2C8 como el CYP2C9 o el CYP3A4. Una situación similar ocurre en la hidroxilación de compuestos importantes toxicológicamente, como el benzopireno y el paration, donde coopera con el CYP3A4. *Es importante destacar que cuando un mismo fármaco u otro compuesto es sustrato de dos CYP diferentes, los productos de reacción son también diferentes.*

El CYP2C8 es relevante en farmacogenómica y toxicogenómica, por la existencia de polimorfismos, existen diversos alelos y SNP con variable frecuencia en la población caucasiana. Es importante reseñar las variantes alélicas CYP2C8\*3 y CYP2C8\*4, los cuales tienen un metabolismo disminuido del antineoplasico paclitaxel, en los microsomas de hígado humano la actividad del enzima 6-(-hidroxilasa sobre el paclitaxel esta disminuida, hasta un 10% para los homocigotos del primer alelo y hasta un 75% para el segundo. *Es de señalar que estas formas alélicas del CYP2C8 contienen generalmente sustituciones de un aminoácido que no suele formar parte del sitio catalítico, sino más bien de las zonas*

*de interacción con otras proteínas microsomales, sobre todo de la reductasa lo que puede llevar a una pérdida de eficacia en el transporte de electrones desde el NADPH y flavinas hasta el grupo hemo del citocromo, sin descartar la posibilidad de interacción con otras proteínas estabilizadoras* (Dai et al. 2001; Bahadur et al. 2002). Además de los polimorfismos existentes en la región codificadora del CYP2C8, que suponen un 20% de heterocigotos para alguno de los alelos en la población caucasiana, existen otros polimorfismos que se encuentran en la zona reguladora del gen y que pueden representar otro 20 % de heterocigotos en la población.

**El CYP2C9** muestra una gran homología de secuencia con CYP2C8 y está en el mismo cromosoma 10, expandiéndose a lo largo de 50732 (50kb) pares de bases, tiene 9 exones y unos intrones de gran tamaño, lo que justifica su gran longitud, codificando una proteína de 490 residuos de aminoácidos. Es el único CYP humano que ha sido cristalizado hasta la fecha (Williams et al. 2003). Entre sus numerosos sustratos destacan el antiepiléptico fenitoina, el anticoagulante warfarina y la sulfonilurea hipoglucemiante, tolbutamida. Otros sustratos son también los antiinflamatorios no esteroideos y la torsemida (demadex). Algunos fármacos pueden comportarse como inhibidores del enzima, entre ellos el fluconazol (diflucan), el ketoconazol (nizoral), el metronidazol (flagyl), el itraconazol (sopranos) y el ritonavir (norvir ) entre otros.

El CYP2C9 muestra polimorfismo genético tanto en la región promotora como en la región codificante, con al menos 5 SNP validados, tienen especial relevancia el CYP2C9\*2 y CYP2C\*3, ambos asociados con una marcada disminución en la capacidad metabólica de sus sustratos, comparados con el gen normal CYP2C9\*1. Otra variante ha sido solamente identificada en los afro-americanos CYP2C9\*5. En todos estos casos una reducción en la dosis de los medicamentos prescritos es necesaria, demostrando la importancia del análisis de polimorfismos en la farmacogenómica. Es importante destacar que la warfarina, importante anticoagulante, sobre todo el enantiómero S-warfarina, que tiene un escaso margen terapéutico, es metabolizado casi exclusivamente por este citocromo CYP2C9 y que la administración conjunta con fármacos inhibidores, o la presencia de polimorfismos menos eficaces como los CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3, puede resultar en cuadros clínicos severos con

abundantes hemorragias, siendo especialmente relevante en los individuos portadores de dos alelos CYP2C9\*3. La presencia de estos alelos se ha asociado también con una mayor incidencia de cáncer de pulmón (García-Martín et al. 2002; Xie et al,2002).

**El CYP2C19**, comparte un 92% de homología de secuencia con el CYP2C9, difiriendo solamente en 43 de los 490 residuos, se encuentran además localizados muy próximos en el cromosoma 10. Sin embargo los dos enzimas tienen una especificidad de sustrato completamente diferente. El CYP2C19 muestra polimorfismo genético, siendo los mas destacados CYP2C19\*2, CYP2C19\*3 y CYP2C19\*4, el enzima esta ausente en un 3% de los caucasianos y un 20% de los japoneses. Entre los sustratos se encuentran la clomipramina (anafranil), el diazepam (valium), la imipramina (tofranil), el omeprazol (prilosec), el propranolol (inalderal) etc... Estos compuestos no son sustratos exclusivos y pueden ser metabolizados por otros CYP, lo que explica que la ausencia de este citocromo no resulte demasiado significativa en tratamientos con los compuestos citados. Entre los inhibidores de este citocromo se encuentran la fluoxetina (prozac), la sertralina (zoloft), el propio omeprazol y el ritonavir (norvir).

Recientemente el CYP2C19 y sus polimorfismos han cobrado fuerza pues es capaz de metabolizar la talidomida produciendo los metabolitos activos hidroxilados 5-hidroxitallidomida y cis-5'-hidroxitalidomida. Esta sustancia conocida por los desgraciados efectos teratogénicos en fetos, se emplea de nuevo actualmente como hipnótico suave y sobre todo por sus efectos antiangiogénicos, impidiendo la vascularización de los tumores. En esta acción son los metabolitos hidroxilados los que son activos y dependen de la existencia de un citocromo funcional. En ensayos clínicos se ha demostrado que en los portadores del alelo CYP2C19\*2 la talidomida no tiene efecto en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Ando et al. 2002).

**La subfamilia D, CYP2D**, tiene tres miembros hasta el momento, en humanos, el CYP2D6, el CYP2D7 y el CYP2D8, todos ellos en el cromosoma 22.

**El CYP2D6** es el miembro más característico de la familia, es excepcionalmente relevante, pues más de 75 fármacos utilizados con frecuencia son metabolizados por esta enzima. El polimorfismo del CYP2D6 es quizás el más estudiado entre todos los implicados en metabolismo de fármacos y

es además donde se han encontrado el mayor número de variaciones. A nivel del DNA, el gen del CYP2D6 se expande aproximadamente 7 kbases.

Tiene este citocromo el honor de ser el primero para el que se detectaron amplias variaciones en su actividad entre la población. Las primeras evidencias de fallos de “algún” sistema de hidroxilación se deben a los estudios farmacocinéticos del hipotensor debrisoquina, recogiendo la orina para medir el fármaco eliminado sin metabolizar y su metabolito hidroxilado, la 4-hidroxi-debrisoquina. El cociente entre el fármaco sin hidroxilar y la forma hidroxilada daba la relación de los “buenos” o “malos” hidroxiladores (metabolizadores). Un 7% de los caucásicos y 1% de los asiáticos carecen de citocromo funcional. Hay enormes variaciones en la actividad entre las diferentes poblaciones sobre todo con las africanas, y es uno de los genes que más fácilmente duplica, existiendo algunos individuos con copias múltiples del gen. Hasta 12 copias del gen se han observado en una familia. Estos hechos, junto con que la población general tiene otros dos genes de citocromos CYP2D7 y CYP2D8 en la zona próxima a la de iniciación de este gen, sugieren que debe existir una zona previa al gen que facilita la duplicación y/o la amplificación del CYP2D6. Este hecho junto con la gran diversidad de fármacos que es capaz de metabolizar hacen que el CYP2D6 sea uno de los mejor estudiados.

Entre los sustratos del CYP2D6 se encuentra la codeína, que es transformada en morfina, lo que explica su acción analgésica. En los individuos con escasa actividad de este citocromo, el metabolismo de la codeína es escaso y no manifiesta la acción analgésica, mientras que el metabolismo incrementado produce náuseas o síntomas de euforia. Otros sustratos son la desipramina y otros antidepresivos tricíclicos.

Antes de que las técnicas de genética molecular se convirtieran en rutinarias y permitieran un amplio muestreo de la población se conocía la existencia de cuatro variantes alélicas del CYP2D6: (A), (B), (C) y (D), que reciben actualmente otras denominaciones. Actualmente se conocen más de 77 SNP, con diferente incidencia en el metabolismo.

El alelo denominado antiguamente CYP2D6(A) se conoce actualmente como **CYP2D6\*3A**, ha sufrido la delección de una adenina en el exón 5 (**2549A>del**) y el resultado es una terminación prematura de la proteína, careciendo por completo de actividad.

El alelo CYP2D6(B), se conoce actualmente como **CYP2D6\*4** ha cambiado una guanina a adenina en el ultimo nucleótido del intrón 3 (**1846G>A**), lo que produce un cambio en el procesamiento del mensajero. De este alelo se conocen otras variantes en las cuales coexisten otros SNP junto con el descrito. Esta isoforma CYP2D6\*4, confiere susceptibilidad a Parkinson tardío, sobre todo en personas dedicadas a faenas agrícolas por la exposición a pesticidas (Migliore and Copedé, 2002).

El alelo CYP2D6(C), actualmente **CYP2D6\*9** es muy raro, y ha sufrido la delección de tres bases (**2613-2615 del AGA**), lo que origina la eliminación de una lisina, la actividad del citocromo esta disminuida.

El alelo (D), actualmente **CYP2D6\*5**, es el resultado de una delección que elimina la mayor parte del gen. Estas variantes han sido encontradas en el 95% de la población que metaboliza mal la debrisoquina.

Las descripciones de cada alelo de los 77 localizados hasta el momento, están disponibles en la hoja web: <http://www.imm.ki.se/cypalleles>. Existen además los individuos que poseen múltiples copias del gen. Estos individuos son poco frecuentes entre las poblaciones europeas, pero muy abundantes entre los africanos, lo que plantea serios problemas cuando son recetados con fármacos dependientes de este enzima para su metabolismo (Evans and McLeod, 2003; Weinshilboum 2003).

**Otras subfamilias CYP2:** Otras subfamilias pero con menos relevancia son las siguientes, entre paréntesis se hace constar el único miembro de la subfamilia descrito hasta el momento: el CYP2E (1), el CYP2F(1), el CYP2J(2), estas enzimas ayudan en el metabolismo de fármacos. Otras subfamilias cuya función es hasta el momento desconocida son las siguientes, constando entre paréntesis el único, o como mucho dos miembros descritos hasta el momento: el CYP2R(1), el CYP2S(1), el CYP2T(2,3) el CYP2U(1) y el CYP2W(1). Los genes de estas proteínas están en el gran grupo del cromosoma 19. Es posible que muchos de ellos participen en reacciones del metabolismo, síntesis y degradación de compuestos endógenos.

**El CYP2E1**, se expande 11,7 Kb en el cromosoma 19 y contiene 11 exones. Merece una especial mención, pues esta implicado en el metabolismo de compuestos endógenos tales como la acetona y varios acetales, y de compuestos exógenos tan relevantes como el etanol, cuando es



oxidado por el sistema microsomal, que además es un sistema inducible. Otros compuestos exógenos metabolizados son el benceno, tetracloruro de carbono, etilen-glicol, nitrosaminas etc. Por esta capacidad metabólica el CYP2E1 se ha relacionado con procesos tales como la gluconeogénesis, la cirrosis hepática, la diabetes y el cáncer.

Desgraciadamente existen varios tipos de nomenclatura para nombrar los alelos del CYP2E1, lo que hace más compleja una exacta correspondencia de los datos bibliográficos con la nomenclatura que trata de establecerse en este capítulo. El CYP2E1 presenta polimorfismo genético y se han descrito 13 alelos hasta el momento, los cuales se han tratado de relacionar con diversas susceptibilidades. Una de ellas es la adicción al alcohol, en donde los individuos portadores de los alelos RsaI c2 (CYP2E1\*5A y CYP2E1\*5B), en los cuales hay un cambio de una citosina por timina en la zona no codificante (-1053) y los portadores del alelo DraI C (CYP2E1\*1D y CYP2E1\*6) son más frecuentes, sobre todo en la población de origen mejicano de los Estados Unidos. La relación de la cirrosis hepática con el metabolismo del alcohol es un tema complejo, pero el CYP2E1 parece establecer un nexo de unión, pues al ser inducible por alcohol se incrementan sus niveles y las especies reactivas de oxígeno, si además los alelos son menos eficientes, la generación de especies reactivas de oxígeno son más abundantes en el citosol de las células hepáticas. Son las especies reactivas de oxígeno las que producen lesiones mitocondriales, pudiendo producir apoptosis, y cuando la lesión celular es menor pueden inducir la expresión de las moléculas de colágeno, lo que lleva a una esclerotización del tejido.

Otro aspecto importante de la capacidad metabólica del CYP2E1 está relacionado con el metabolismo del fármaco antituberculoso, isoniacida, el cual es metabolizado por una N-acetiltransferasa y también por este citocromo. La N-acetiltransferasa presenta polimorfismos bien conocidos de “buenos y malos” acetiladores, siendo de los primeros polimorfismos descritos, pero el papel del CYP2E1 ha sido subestimado y en estudios de hepatotoxicidad con la isoniacida, el riesgo se incrementa cuando los pacientes son portadores de los alelos CYP2E1 c1/c1, que tienen una actividad más alta que los c2/c2. Estos efectos se suman a una acetilación más lenta (Huang et al, 2003). Finalmente, los individuos portadores de los alelos menos eficaces CYP2E1 c2/c2, parecen sobre expresar la proteína P53, con los efectos consiguientes en riesgo y prevención del cáncer.

## Familia CYP3

La familia CYP3 tiene en humanos una única subfamilia, la CYP3A que contiene cuatro miembros, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43. Todos los genes se encuentran en el cromosoma 7. La expresión de los miembros de esta familia esta regulada en el hígado y en el intestino por diferentes fármacos, utilizando el receptor de esteroides y xenobióticos, conocido como receptor de pregnano (PXR). La existencia de este sistema regulador ofrece una explicación a la capacidad de ciertos fármacos de proteger al organismo frente a los efectos tóxicos de otras sustancias. Un ejemplo conocido es el efecto protector de la pregnenolona frente a la hepato-toxicidad de dosis elevadas de indometacina o digoxina, ya que la pregnenolona y compuestos relacionados son ligandos para el PXR y activan la transcripción de los CYP3A. Un efecto similar es observado con los extractos de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), cuyo componente hipericina puede unirse al citado receptor. Estos genes también son inducidos por fenobarbital y otros compuestos que pueden unirse a la familia de receptores nucleares constitutivos que reconocen las hormonas androgénicas (CAR), las cuales son diferentes de las PXR. Las funciones de los CYP3A7 y CYP3A43 son poco conocidas. El CYP3A7 se expresa en el hígado fetal y en el endometrio uterino y se busca una función.

**El CYP3A4 y el CYP3A5**, son los citocromos más abundantemente expresados a nivel hepático y a todo lo largo del tracto gastro-intestinal. Entre los dos son capaces de metabolizar unos 120 fármacos de los utilizados actualmente, y tienen funciones sobre el metabolismo de compuestos endógenos, como el ácido araquidónico y eicosanoides. Destacan entre los fármacos los siguientes sustratos: benzodiazepinas, bloqueantes de los canales de calcio, carbamazepina, cisapride, eritomicina, etinilestradiol, lovastatina, terfenadina, ketoconazol, verapamil, sertralina, testosterona, teofilina, inhibidores de proteasas (ritonavir, saquinavir, indinavir) etc. Algunos sustratos son a su vez inhibidores en mayor o menor grado y según la dosis, es el caso de los antifúngicos ketoconazol y fluconazol, la eritromicina y los inhibidores de proteasa. Otros fármacos se comportan como inductores: carbamazepina, dexametasona, fenobarbital, fenitoina, rifampina etc. Ambos citocromos expresan polimorfismo genético.

El **CYP3A4** presenta múltiples polimorfismos de un único nucleótido, habiéndose descrito unos 25 SNP, de los cuales hay 14 con amplia distribución. El gen ocupa unas 260 kb y los cambios se producen tanto en las secuencias de sus 17 exones codificantes, como en los intrones y en la zona promotora. Además puede ser procesado de modo alternativo y originar 12 transcritos diferentes, que codifican 12 isoformas del enzima. Se conocen 6 promotores alternativos y 5 exones que pueden ocupar el ultimo lugar sin solapamiento. Es pues un gen extraordinariamente complejo, que puede dar lugar a una gran variedad de proteínas con funciones variadas, que pueden o no solapar entre si.

El CYP3A4 normal es el CYP3A4\*1 (tipo silvestre), de este alelo se conocen 6 SNP con modificaciones en la secuencia no codificante, las cuales reciben una letra después del numero 1: CYP3A4\*1A, B, C, D, E, F. Todas estas modificaciones no repercuten en la actividad de la proteína una vez expresada. No obstante el alelo CYP3A4\*18 tiene un cambio en la base 566 del cDNA de T>C lo que da lugar a la sustitución de una fenilalanina por serina en el aminoácido 189 de la proteína, lo que origina una disminución de la actividad. Por el contrario, el CYP3A4\*18, tiene una sustitución de la base T>C en la posición 878 del cDNA, lo que resulta en una sustitución de leucina por prolina en el aminoácido de la posición 293, lo que produce un notorio incremento de la actividad para la mayoría de los sustratos, cuando se efectúan los estudios *in vitro*.

El **CYP3A5** curiosamente, la mitad de los americanos caucasianos y hasta el 75% de los afroamericanos carecen de capacidad para expresar el CYP3A5 funcional. Se conocen en la actualidad unos 43 SNP de este citocromo, pero la falta de actividad se debe en la gran mayoría a un procesamiento erróneo del transcrito primario del mensajero, con un cambio de nucleótido en el intrón 3 (6986 A>G), este cambio puede coexistir con otros SNP puntuales, todos estos alelos se recogen con la denominación CYP3A5\*3, seguidos de las letras correspondientes (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). En todos ellos se origina un nuevo sitio de procesamiento, introduciendo nuevos nucleótidos y un sitio de terminación prematura. En los SNP CYP3A5\*5 y CYP3A5\*6 también aparecen mutaciones que originan defectos en el procesamiento del mensajero, las proteínas originadas carecen de actividad.

Curiosamente, aunque la presencia de alelos del CYP3A5 carentes de actividad está muy extendida, como comparte sustratos con el CYP3A4,

su ausencia funcional permanece enmascarada y sin síntomas y demás mezclados con los propios polimorfismos del CYP3A4.

## **Familia CYP4**

La familia CYP4 tiene en humanos 5 subfamilias y doce componentes en total. La gran mayoría de sus genes se encuentran en el cromosoma 19, donde ya hemos visto que están localizados casi todos los componentes de la familia CYP2.

Los miembros de la familia CYP4 tienen pocas acciones sobre fármacos, pero son importantísimos sobre el metabolismo de los compuestos endógenos. Los CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2 y CYP4F3 actúan sobre ácidos grasos, ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos, epoxi-eicosa-trienoicos (EETs), hidroxi-eicosa-tetraenoicos (HETEs) y los hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs), esenciales en el mantenimiento y función vascular, otros miembros de esta familia participan en el metabolismo del ácido araquidónico y ácidos grasos en general. La expresión de estos genes está bajo el control de los receptores nucleares conocidos como activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR, tanto el tipo  $\alpha$  como el  $\beta$  y el  $\gamma$ ) estos receptores necesitan la unión del retinoico a una de sus subunidades nucleares, ya que son diméricos. Varios citocromos de las subfamilias CYP4A y CYP4B se expresan en los túbulos distales del riñón y cuando son defectuosos originan serios trastornos en el metabolismo de iones, balance hídrico y presión sanguínea, Las anomalías en estos genes se presentan con características de las enfermedades monogénicas hereditarias, con comportamiento autosómico recesivo.

## **Otras familias de citocromos P-450**

El resto de las familias de CYP, están relacionadas con el metabolismo de compuestos endógenos y solo accidentalmente con el metabolismo de fármacos. Todos los genes que codifican estas proteínas presentan polimorfismos, y cuando la actividad que catalizan se ve seriamente comprometida aparecen enfermedades hereditarias de carácter monogénico.

**La familia CYP5**, tienen solamente un componente, el CYP5A1, pero importantísimo pues es responsable de la síntesis del tromboxano, conocida como tromboxano A2 sintasa. Anomalías en este gen pueden producir alteraciones más o menos graves en la coagulación, enfermedades de las arterias coronarias e hipertensión pulmonar.

**La familia CYP8**, contiene el gen **CYP8A1**, responsable de la síntesis de prostaciclina y se conoce como prostaciclina sintasa, produciendo prostaglandina I<sub>2</sub>. sus acciones son opuestas a las del tromboxano A2, por lo tanto un equilibrio entre ambos genes es necesario para mantener la luz de los vasos y controlar la tensión arterial.

**La familia CYP51**, contiene el enzima clave en la síntesis del colesterol, el CYP51A1, capaz de eliminar por oxidación un grupo metilo del lanosterol, la lanosterol 14(-desmetilasa. Este enzima es la diana de acción de múltiples antifúngicos, como el ketoconazol y es uno de los CYP más conservados evolutivamente, genes análogos se encuentran en bacterias, hongos y animales. Curiosamente este gen se ha perdido en algunas ramas filogenéticas, como la del nematodo *C. elegans* y la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*.

**Las familias, CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 y CYP46**, contienen enzimas capaces de hidroxilar diversas posiciones del colesterol y acortamiento de la cadena final carbonada, produciendo ácidos biliares y oxisteroles, estos compuestos pueden regular su propia síntesis asociándose con el receptor de farnesoides, que es un receptor nuclear formando dímeros con los receptores de retinoico.

Es importante destacar que el **CYP46A2 se expresa casi exclusivamente en neuronas del sistema nervioso central**, transformando el colesterol en 24-S-hidroxicolesterol, este oxisterol es permeable en la barrera hematoencefálica y permite la excreción del colesterol de cerebro y su posterior transformación en ácidos biliares en el hígado para ser excretado (Lund et al. 1999).

Todos estos genes presentan polimorfismos y se han caracterizado mutaciones asociadas con enfermedad en alguno de estos enzimas, como la **CYP7A1, cuya pérdida de actividad origina un tipo de hipercolesterolemia**, que es resistente a las estatinas, ya que el fallo no esta en la síntesis, sino en la eliminación en forma de ácidos biliares.

**Existen mas de 50 mutaciones diferentes conocidas del CYP27A1**, todas ellas en personas que sufren la enfermedad genética denominada xantomatosis cerebrotendinosa, con daños neurológicos severos.

**Las familias CYP11, CYP17, CYP19 y CYP21** son esenciales en la síntesis de esteroides hormonales. Estos genes están regulados durante la embriogénesis por un factor de transcripción nuclear. **Los genes CYP11A1, CYP11B1 y CYP11B2 son enzimas mitocondriales**, fallos en estos enzimas originan diversos tipos de disfunciones de la corteza adrenal y sus corticosteroides y mineral corticoides asociados. Anomalías con pérdida de función del CYP19A1, necesario para la aromatización del anillo androgénico y por lo tanto formación de estrógenos, causa virilización en las mujeres, pero cuando esta totalmente ausente en el varón se produce hipervirilización en el hombre, con problemas en la formación y reorganización de los huesos, indicando que tanto en el hombre como en la mujer los estrógenos son necesarios en el funcionamiento de las células óseas. En casos excepcionales cuando el polimorfismo del CYP19A1 implica un incremento de su actividad se produce ginecomastia en los varones.

**Las familias CYP24 y CYP27**, están implicadas en el metabolismo de la Vitamina D, tanto síntesis como degradación (Wikvall 2001), con los enzimas **CYP24A1, CYP27A1, CYP27B1**, y de otras enzimas anteriormente citadas por sus funciones en el metabolismo de fármacos, que son el CYP2D6 y el CYP3A4.

**Finalmente la familia CYP26**, que tiene tres genes, está implicada en la hidroxilación del ácido retinoico, cada uno de ellos en una subfamilia, **CYP26A1, CYP26B1 y CYP26C1**, los tres genes parecen evolucionar de un gen ancestral hace 150-200 millones de años. El ácido retinoico es un importante factor morfogenético durante el desarrollo de los vertebrados y actúa a través de los receptores de retinoico, capaces de formar dímeros con otros muchos receptores a nivel de núcleo celular.

## CONCLUSIÓN

Cuanto más se profundiza en el conocimiento de los CYP, más se aleja la visión inicial de unos enzimas destinados a la simple defensa de

nuestro organismo de agentes externos aportados en la alimentación y más recientemente ingeridos como fármacos.

Los CYP realizan funciones excepcionales en el metabolismo de bacterias, hongos, vegetales y animales, de los cuales las personas son un componente más. En todos ellos funciones esenciales como la síntesis de colesterol, los esteroides hormonales, ya sean hormonas sexuales, corticosteroides o mineral corticoides, la síntesis de ácidos biliares, la síntesis de la vitamina D, las modificaciones del ácido retinoico, la producción de las prostaglandinas, tromboxanos, y otros derivados de araquidónico con función vascular, necesitan la presencia de alguno de los múltiples citocromos CYP.

Pero el ser humano ha modificado y dominado el entorno y entre sus primeros logros esta el fuego. La introducción de los alimentos cocinados directamente a la llama bien “churruscados” fue desde su conquista un placer, pero también supuso el desviar algunos citocromos de su función primitiva, o darles una función añadida, originándose compuestos que una vez hidroxilados no suponían ninguna ventaja, pues podían convertirse en cancerígenos por la acción de los CYP. Podemos pensar que el fuego puede y pudo servir como factor seleccionador de los individuos menos sensibles a los efectos cancerígenos de los hidrocarburos aromáticos desde su aparición hace medio millón de años.

Una filosofía similar se podría aplicar al ingente arsenal de fármacos, algunos de ellos parecidos a sustancias naturales más o menos peligrosas, pero sin duda ingeridas siempre en menor concentración y cantidad de las recetadas para el tratamiento de las dolencias. Con el empleo generalizado de fármacos estamos desviando de su función o añadiendo funciones a otras familias de citocromos, cuyas consecuencias veremos en futuras generaciones. Es en este aspecto donde los polimorfismos de los CYP han saltado a la palestra como elementos importantes para evitar efectos secundarios en la medicación. ¿Podríamos pensar que los fármacos y otras sustancias químicas ampliamente empleadas, se pueden convertir en elementos de selección de individuos con unas ciertas características? Al igual que con el fuego necesitaremos varios cientos de miles de años para comprender la respuesta.

Finalmente, la estimulación e inducción de los sistemas CYP tanto del retículo, como mitocondriales, paga un peaje en la salud hepática, pues la



reacción de hidroxilación de los CYP es muy poco eficaz, tanto con los genes normales, y mucho más con los genes que presentan polimorfismos. En esta reacción siempre producen como productos secundarios especies reactivas de oxígeno, ya sea el ión superóxido, o el agua oxigenada, que pueden inducir situaciones de estrés de diferente grado y consecuencias.

*Los CYP y sus polimorfismos, son un libro abierto de la evolución de los humanos en relación con otras especies. Contienen también la memoria genética de su propia experiencia como especie independiente, de su interacción con el entorno y más recientemente de su propia modificación del entorno. Para nuestra tranquilidad, o desasosiego, el libro se sigue escribiendo.*

## PÁGINAS ELECTRÓNICAS

Cytochrome P-450 Homepage: [http://drnelson.utmem.edu/Cytochrome P-450.html](http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html).

Polimorfismos CYP: <http://www.imm.ki.se/cypalleles>

## REFERENCIAS

- Ando Y., Price D.K., Dahut W.L., Cox M.C., Reed E. and Figg W.D. (2002). Pharmacogenetics associations of CYP2C19 genotype with in vivo metabolisms and pharmacological effects of thalidomide.
- Backes, W.L.& Kelley, R.W. (2003). Organization of multiple cytochrome P-450s with NADPH-cytochrome P-450 reductase in membranes. *Pharmacology and Therapeutics*, 5534. 1-13.
- Bahadur N et al.(2002). CYP2C8 polymorphisms in caucasians and their relationship with paclitaxel 6(hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 64, 1579-1589.
- Baldwin S.J., Clarke S.E., Chenery R.J. (1999). Characterization of the cytochrome P-450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *Br. J. Clin Pharmacol* 48, 424-432.
- Dai D., Zeldin D.C., Blaisdell J.A., Chanas B., Coulter S.J., Chanayem B.I. and Goldstein J.A. (2001). Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 11,597-607.

- Davydov D. R. (2001). Microsomal monooxygenase in apoptosis : another target for cytochrome c signalling?. *TIBS*, 26, 155-160.
- Estabrook R.W., Cooper D.Y. and Rosenthal O. (1963). The light-reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylation system of the adrenal cortex. *Biochem. Zeit.* 338, 741-745.
- Evans W.E. and McLeod H.L., (2003). Pharmacogenomics- Drug disposition, Drug targets, and side effects. *N. England J. Med.* 348, 538-549.
- Garcia-Martin E., Martinez C, Ladero J.M., Gamito F.J., Rodríguez-Lescure A. and Agundez J.A. (2002). Influence of cytochrome P-450CYP2C9 genotypes in lung cancer risk. *Cancer letters*, 180, 41-46.
- Graham-Lorence S. and Peterson J.A. (1996). P-450s: Structural similarities and functional differences. *FASEB J.* 10, 206-214.
- Guengerich F. P. (2002). Cytochrome P-450 enzymes in the generation of commercial products. *Nature reviews, Drug discovery*, 1, 5 359-366.
- Honkakoski P. and Negishi M. (2000). Regulation of Cytochrome P-450(CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 347, 321-337.
- Huang Y-S, Chern H-D, Su W-J, Wu J-C, Chang S-C; Chiang C-H, Chang F-Y and Lee S-D (2003). Cytochrome P-450-2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 37, 924-930.
- Lund e.G., Guileyardo J. M. Russell D.W. (1999). CDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 72-38-7243.
- Migliore L. and Coppedè F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research* 1-19.
- Muck W. (2000). Clinical pharmacokinetics of cerivastatin. *Clin Pharmacokinet.* 39, 99-116.
- Nebert D.W (2000). Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics*, 10, 279-290.
- Nebert D.W. and D.W. Russell (2002). Clinical importance of the cytochromes P-450. *The Lancet*, 360,1155-1162.
- Soley G.C. et al.(2003). Primary congenital glaucoma: a novel single-nucleotide deletion and varying phenotypic expresión for the 1,546-1,555dup mutation in the GLC3A (CYP1B1) gene in 2 families of different ethnic origin. *J. Glaucoma.* 12, 27-30.
- Vineis P. et al.(2003). CYP1A1 T3801C polymorphism and lung cancer: a pooled análisis of 2451 cases and 3358 controls. *Int. J. Cancer.* 104, 650-657.

- Weinshilboum R. (2003). Inheritance and drug response. *N. Engl. J. Med.* 348 2003, 529-537.
- Wikvall K. (2001). Cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form. *Intl. J. Mol. Med.* 7, 201-209.
- Williams P.A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E.F. and McRee D.E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrana binding and functional diversity. *Mol. Cell* 5, 121-131
- Williams P.A., Cosme J., Ward A., Angove H.C., Vinkovic D.M. and Jhoti H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P-450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424, 464-468.
- Xie H-G, Prasad H, Kim R.B. and Stein C.M. (2002). CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Advanced Drug Delivery reviews* 54, 1257-1270.
- Xu C., Goodz S., Sellers E.M. and Tyndale R.F. (2002), CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *ADV. Drug. Deliv. Rev.* 54, 1245-1256.